

# 三种不同冷冻保护剂对小鼠附睾冷冻效果的比较

李淼<sup>1</sup>, 郁丽丽<sup>2</sup>, 张艺宝<sup>3</sup>, 强苏静<sup>2</sup>, 刘丽均<sup>2</sup>, 徐平<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 201615; 2. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615;  
3. 南京农业大学动物医学系, 南京 210095)

**【摘要】** 目的 探讨三种不同冷冻保护剂对 C57BL/6J 小鼠附睾冷冻的效果。方法 性成熟并交配过的 6~8 周龄 C57BL/6J 雄鼠附睾, 分别用 3 种不同冷冻保护剂二甲基亚砜 (DMSO)、丙二醇 (PROH)、R<sub>1883</sub> 进行玻璃化冷冻、复苏和精子采集, 观察比较三个实验组的复苏精子形态、存活率以及生殖能力。结果 三组冷冻复苏分离后的精子形态完整, 具有镰刀头状结构; 荧光染色后 PROH 组精子存活率为 (88.17 ± 3.43)%, 明显高于 DMSO 组: (61.17 ± 10.65)% 和 R<sub>1883</sub> 组 (16.83 ± 6.49)% ( $P < 0.05$ ); 经辅助体外受精后均具有受精能力。获得的胚胎移植后可得到正常子代小鼠 (DMSO: PROH: R<sub>1883</sub> = 13: 8: 17)。结论 3 种冷冻保护剂均适用于 C57BL/6J 小鼠附睾冷冻, 但 PROH 冷冻效果较好。

**【关键词】** 小鼠附睾; 冷冻保护剂; 冷冻效果

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0062-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.014

## Comparison of the effect of three cryoprotectants on vitrification-cryopreservation of mouse epididymis

LI Miao<sup>1</sup>, YU Li-li<sup>2</sup>, ZHANG Yi-bao<sup>3</sup>, QIANG Su-jing<sup>2</sup>, LIU Li-jun<sup>2</sup>, XU Ping<sup>1,2</sup>

(1. Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201615, China;  
2. Shanghai SLAC Laboratory Animal Ltd. Co., Shanghai 201615;  
3. Veterinary College of Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

**【Abstract】** **Objective** To compare the effect of three cryoprotectants on vitrification-cryopreservation of C57BL/6J mouse epididymis. **Method** Epididymises from 6-8-week old male C57BL/6J mice (age) were cryopreserved using DMSO, PROH and R<sub>1883</sub> cryoprotectant solution and thawed, respectively. The morphology of sperm from thawed epididymis, the rate of post-thawing survival and reproductive capacity were determined to evaluate the freezing efficiency of the three cryoprotectants. **Results** The sperms from thawed epididymis of the three groups were all well-preserved structurally. The survival rate of sperms was 88.17%, 61.17% and 16.83% in the PROH, DMSO and R<sub>1883</sub> cryoprotectant solutions, respectively, and there were significant differences between the three cryopreservation groups ( $P < 0.05$  for all). The number of pups from the DMSO, PROH and R<sub>1883</sub> groups were 13, 8 and 17 mice after ICSI and embryo implantation, respectively. **Conclusions** All the three cryoprotectants DMSO, PROH and R<sub>1883</sub> solutions are suitable for vitrification-cryopreservation of C57BL/6J mouse epididymis. But PROH is the preference of these cryoprotectant solutions.

**【Key words】** Mouse; Epididymis; Cryoprotectant solution; Freezing efficiency; Vitrification

[基金项目] 上海市科研计划项目 (111409022700); 国家科技支撑计划课题 (2013BAK11B02)。

[作者简介] 李淼 (1989 -), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物生殖工程和低温生物学, limiao@sibs.ac.cn

[通讯作者] 徐平, 研究员, E-mail: pingxu@sibs.ac.cn

1949 年英国的 Polge 和 Smith 等<sup>[1]</sup>在偶然情况下,发现低温保存精子时加入甘油,可以增加精子的活力,揭开了低温生物学发展的里程碑。小鼠作为研究哺乳动物胚胎发育以及人类遗传疾病的典型模式动物,在生命科学领域发挥着至关重要的作用。低温冷冻保存生殖细胞、生殖组织以及胚胎,这种更安全可靠的方法是保存具有研究价值品系小鼠的关键<sup>[1,2]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

C57BL/6J、ICR 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】,在独立换气笼盒系统(IVC)饲养,动物自由采食<sup>60</sup>Co 灭菌饲料(30KGy)和高压灭菌水,其他饲养环境和条件严格参照 IVC 使用手册以及无特定病原动物(SPF 级动物)饲养标准操作规程(SOP)执行。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

体视显微镜(Nikon SMZ645);解剖显微镜(Nikon CP-S);荧光显微镜(Leica DMI3000 B);CO<sub>2</sub> 培养箱(Hera, Cell, Kandro)。二甲基亚砜;丙二醇;L-15 培养液;1 × HBSS;胎牛血清(FBS);LIVE/DEAD Sperm Viability Kit(L-7011)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 附睾组织采集

性成熟并交配过 6~8 周龄 C57BL/6J 雄鼠,处死后从腹腔内取出附睾。在 0℃ L-15 培养液中清洗去除多余脂肪、血渍及其他组织,4℃ 1 × HBSS 液中保存。

#### 1.2.2 冷冻和复苏

将采集的组织随机放入含有 1.0 mL 冷冻保护剂的 1.8 mL 冷冻管中(2 个/管)。二甲基亚砜组 0℃ 30 min 196℃ 液氮中保存;丙二醇组 4℃ 30 min -196℃ 液氮中保存。R<sub>18S3</sub> 组液氮表面 10 min 液氮保存。每组随机选取 10 个附睾冷冻,其中 3 个附睾用于荧光染色以及精子形态检测,另外 6 个用于胞质内单精子注射。

二甲基亚砜冷冻保护剂成分:L-15 培养液、1.5 mol/L 二甲基亚砜、0.05 mol/L 蔗糖、10% (v/v) 胎牛血清。丙二醇冷冻保护剂成分:L-15 培养液、1.5 mol/L 丙二醇、0.05 mol/L 蔗糖、10% (v/v) 胎牛血清。另一种冷冻保护剂为 R<sub>18S3</sub><sup>[16]</sup>。

将采集的组织随机放入含有 1.0 mL 冷冻保护剂的 1.8 mL 冷冻管中(2 个/管)。二甲基亚砜组 0℃ 30 min -196℃ 液氮中保存;丙二醇组 4℃ 30 min -196℃ 液氮中保存。R<sub>18S3</sub> 组液氮表面 10 min 液氮保存。

复苏:37℃ 水浴复苏。二甲基亚砜及丙二醇组去除冷冻保护剂分 4 步完成,每步 5 min。①1.0 mol/L 二甲基亚砜(丙二醇)、0.05 mol/L 蔗糖、10% 胎牛血清、L-15。②0.5 mol/L 二甲基亚砜(丙二醇)、0.05 mol/L 蔗糖、10% 胎牛血清、L-15。③0.05 mol/L 蔗糖、L-15。④L-15。以上步骤均在 37℃ 水浴锅内完成。

#### 1.2.3 分离提纯精子

复苏后的附睾组织在含有 37℃ HTF<sup>[22]</sup> 培养液(200 μL)的 EP 管内充分剪碎使精液溶解在 HTF 液中,37℃ 孵育 20 min,轻微震荡。低速离心 1 min (800 r/min.),37℃ 孵育 10 min,选取上层精液 1:20 稀释,铺片,显微镜下观察,随机抽取 6 个视野,分别统计镰刀头状精子和运动精子百分比并求均值、方差以及 *P* 值。

#### 1.2.4 荧光染色

按照 LIVE/DEAD Sperm Viability Kit 说明书进行实验操作。铺片,荧光显微镜下观察。显微镜下随机抽取 6 个视野,分别统计绿色和红色荧光精子百分比并求均值、方差以及 *P* 值。

#### 1.2.5 显微操作和移植

采集、消化卵子细胞,挑选有第一极体的卵子备用。将上述分离所得上层精子悬浮液(3 μL)加入 5% PVP 液滴,调整参数分离精子头并注射到卵子内。M16 培养液培养。24 h 后统计 2-细胞数目并输卵管移植,19~21d 后统计其产仔数。

#### 1.2.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行 *t* 检验等相关数据分析。*P* < 0.05 具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 精子形态

从三种冷冻保护剂(DMSO、PROH、R<sub>18S3</sub>)冷冻的附睾中分离出的精子在显微镜下观察(图 1,彩插 6)。三个实验组的精子形态结构均保存完整,87% 以上精子为镰刀状,DMSO 组 7.6% 精子仍有运动能力但其游速缓慢、摆尾频率低,PROH 组 4.4%,R<sub>18S3</sub> 组 9.2%。故该精子不能用于体外受精必须借助辅

助生殖技术即胞质内单精子注射以及胚胎移植技术获得子代。

## 2.2 荧光染色

三个实验组的精子染色,铺片,荧光显微镜下观察(图 2,彩插 6)。R<sub>18S3</sub> 组 (16.83 ± 6.49)% 精子发绿光即质膜完整,PROH 组 (88.17 ± 3.43)%,DMSO 组 (61.17 ± 10.65)%。PROH 组、DMSO 组效果明显优于 R<sub>18S3</sub> 组,三个实验组两两间差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

## 2.3 显微操作及胚胎移植

分离提纯的三组实验组精子经卵胞浆内单精子显微注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 后可以培养发育成 2-细胞,胚胎移植后可得到小鼠子代个体(表 3)。三个实验组共用 10 只假孕母鼠,共产 38 只小鼠,其中丙二醇组出生率最低。子一代合笼交配可产生正常子二代。结果表明冷冻复苏后的

表 3 三个实验组精子 ICSI 及胚胎移植结果

Tab. 3 Numbers of 2-cell embryos and pups after sperm ICSI and implantation

组别 Groups	供体卵子/枚 Donor ova	2-细胞胚胎/枚 2-cell embryos	受体鼠/只 Recipient mice	妊娠率/% Pregnancy rate	仔鼠数/只 Pup mice	雌:雄 ♀:♂
二甲基亚砷组(DMSO)	74	48	3	67	13	4:9
丙二醇组(PROH)	75	47	4	25	8	6:2
R <sub>18S3</sub>	68	41	3	67	17	10:7

## 3 讨论

低温生命冻存是指在 -80℃ (干冰温度) 至 -196℃ (液氮温度) 下保存生命结构。而在低温生命冻存技术中,玻璃化冷冻技术应用最为广泛。所谓玻璃化冷冻,是使细胞及其保护剂溶液以足够快的降温速率,过冷到所谓玻璃化转变温度,而被固化成完全的玻璃态,并以这种玻璃态在低温下长期保存的技术<sup>[1]</sup>。目前保护剂分为渗透性(二甲基亚砷、丙二醇等)和非渗透性(蔗糖等)。Keros<sup>[10]</sup> 和 Milazzo 等<sup>[11]</sup> 研究发现冷冻睾丸组织二甲基亚砷的效果要优于其他几种保护剂。本实验用于冷冻附睾的保护剂中丙二醇冷冻的精子质膜破损比例最低(11.83%),效果优于其他两种冷冻液(R<sub>18S3</sub>: 83.17%,DMSO: 38.83%)。丙二醇作为冷冻保护剂在小鼠 2-细胞胚胎、人类血管平滑肌细胞等低温保存方面发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。本实验结果表明:丙二醇相比 DMSO 和 R<sub>18S3</sub>,更适用于小鼠附睾的冷冻保存。此外,同时使用两种冷冻保护剂比单独使用任何一种保护剂的冷冻效果好,更能充分降低保护剂对细胞结构以及功能的影响,一般是渗透性与非

精子仍具有正常的生殖发育活性,并且冷冻处理未损伤遗传物质。

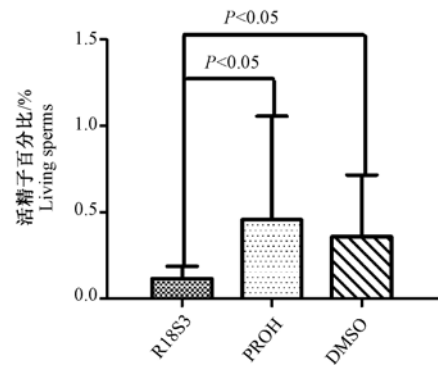


图 3 荧光染色后绿色荧光精子的比例

Fig. 3 Survival rates of sperms after cryopreservation and thawing. Fluorescent staining.

渗透性保护剂同时使用<sup>[13]</sup>。本实验采用二甲基亚砷、丙二醇等渗透性保护剂和非渗透性保护剂蔗糖,混合作为冷冻保护剂。此外针对每种冷冻保护剂采取相应的最优平衡条件,因 DMSO 温度越高毒性越大所以 0℃ 平衡而综合渗透性及毒性等因素 PROH 宜 4℃ 平衡处理,平衡后统一液氮内保存。以前相关工作中二甲基亚砷以及丙二醇作为保护剂均采用程序快(慢)速降温<sup>[2-9]</sup>,但在本实验中采取一步玻璃化冷冻,热传导更快,结果显示冷冻效果良好,精子形态完整、仍具有正常的生殖发育能力。能够使卵子受精发育成 2-细胞、4-细胞甚至囊胚。之前程序降温工作仅仅研究了结构形态变化并未检测其生理功能是否完善。本实验精子经 ICSI 后的受精率约 60% 左右,所得的 2-细胞胚胎经输卵管内移植后均可得到仔鼠(DMSO 组: 13 只,PROH 组: 8 只,R<sub>18S3</sub> 组: 17 只)。子一代 7 周龄时按 1 ♀: 1 ♂ 进行交配可得到子二代个体,说明子一代具有正常的繁殖性能,以此判定冷冻复苏处理并未影响精子的遗传物质。子一代个体数目较少的原因可能是 ICSI 操作过程中脉冲级别过大、PVP 浓度过高、PVP 注射进入卵子过多、透明带损伤等都会影响卵子正常受

精以及后续卵裂发育;胚胎移植时输卵管切口位置、大小,多余溶液等影响了胚胎发育。

为了更直观的检测冷冻效果,采用 LIVE/DEAD Sperm Viability Kit 试剂盒检测精子存活率。荧光分子探针染色法、常规染色及低渗膨胀试验是目前精子存活率主要评价方法,均应用于临床试验<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,三个实验组两两之间具有差异性,PROH 组仅有 11.83% 精子质膜破损,明显低于另外两组。由于附睾表层致密膜阻碍冷冻剂充分渗透到细胞内,使得细胞内仍有大量水分存在,极易在冷冻过程中形成内外冰晶,以及渗透压不平衡会对精子内部亚细胞结构及细胞膜完整性产生损伤致使精子死亡<sup>[15]</sup>。为避免此类问题,在进一步的研究中将选择分子量更小、渗透能力更强的冷冻保护剂,以尽可能的减少对细胞生物活性的影响。

另外还存在着子代个体的主要遗传物质、基因型、关键蛋白表达以及发育情况是否与正常小鼠一致等问题。冷冻过程中对亚细胞结构例如线粒体的损伤等问题,以及本实验所用的冷冻保护剂、方法是否适用于其他品系小鼠包括基因工程小鼠和疾病小鼠模型,需要进一步研究。

(本文图 1,2 见彩插 6。)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Ehmcke J, Schlatt S. Animal models for fertility preservation in the male [J]. *Reproduction*, 2008, 136:717 - 723.
- [ 2 ] Hredzak R, Ostro A, Ždilová V, et al. Survival of mouse embryos after vitrification depending on the cooling rate of the cryoprotectant solution [J]. *Acta Vet Hung*, 2006, 54(1):117 - 125.
- [ 3 ] 朱伟杰,姚汝华,梁蔚波,等. 冷冻保存对人类精子顶体蛋白酶的影响 [J]. *暨南大学学报*, 1998, 19(3):105 - 108.
- [ 4 ] 朱伟杰,姚汝华,梁蔚波,等. 冷冻保存对人类附睾精子功能的影响 [J]. *暨南大学学报*, 1999, 20(6):115 - 118.
- [ 5 ] 朱伟杰,刘学高. 人类精液一步冷冻法研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 1993, 19(2):153
- [ 6 ] 陆晔,唐一岷,刘丽均,等. 不同品系小鼠精子冷冻及冻融精子体外受精的研究 [J]. *上海交通大学学报*, 2003, 21(12):6 - 13.
- [ 7 ] Nakagata N. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice [J]. *Exp Anim*, 1995, 44(1):1 - 8.
- [ 8 ] Tada N, Sato M, Yamanoi J, et al. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol [J]. *Reprod Fertil*, 1990, 89:511 - 516.
- [ 9 ] Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa [J]. *Mammalian Genome*, 2000, 11:572 - 576.
- [ 10 ] V Keros, K Hulthenby, B Borgström, et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment [J]. *Human Reprod*, 2007, 22(5):1384 - 1395.
- [ 11 ] Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice [J]. *Human Reprod*, 2008, 23(1):17 - 28.
- [ 12 ] Vanderzwalmen P, Zech N, Lejeune B, et al. Vitrification and the use of high concentrations of cryoprotectants: Is it a justified argument to prefer slow freezing? [J]. *Gynec Obstet Fertil*, 2010, 38:536 - 540.
- [ 13 ] Lawson A, Ahmad H, Athanassios Sambanis A. Cryotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions [J]. *Cryobiology*, 2011, 62(2):115 - 122.
- [ 14 ] 赵洪鑫,袁瑶,华敏敏,等. 用 Transgreen/PI 荧光复染法检测精子的存活率 [J]. *中国男科学杂志*, 2008, 22(4):1 - 4.
- [ 15 ] Iaffaldano N, Di Iorio M, Pina Rosato M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide [J]. *Theriogenology*, 2012, 78:1381 - 1389.
- [ 16 ] Takeo T, Nakagata N. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- $\beta$ -cyclodextrin in a pre-incubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm [J]. *Lab Animals*, 2010, 44:132 - 137.
- [ 17 ] Gosden R, Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART [J]. *Reproduction*, 2002, 123:3 - 11.
- [ 18 ] Schlatt S, Honaramooz A, M Boiani M, et al. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(6):2331 - 2335.
- [ 19 ] Jin B, Kawai Y, Hara T, et al. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85:834 - 847.
- [ 20 ] Quinn P, Kerin JF, Warnes GM, et al. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid [J]. *Fertil Steril*, 1985, 44:493 - 498.

[ 收稿日期 ] 2013-09-19